

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 747**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2010 E 10704115 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2382474**

54 Título: **ICAM 1 soluble como biomarcador para predicción de respuesta terapéutica**

30 Prioridad:

**20.01.2009 EP 09305044**

**07.04.2009 EP 09305294**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**28.05.2015**

73 Titular/es:

**TRANSGENE SA (100.0%)  
Boulevard Gonthier d'Andernach Parc  
d'Innovation, CS80166  
67405 Illkirch Graffenstaden, FR**

72 Inventor/es:

**ACRES, BRUCE y  
MARIE-BASTIEN, BÉRANGÈRE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 536 747 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

ICAM 1 soluble como biomarcador para predicción de respuesta terapéutica

La presente invención se refiere al campo de la inmunología y, en particular, a la inmunoterapia de un paciente contra las enfermedades originadas por ejemplo por infección o cánceres. Más particularmente, la invención se refiere a métodos para predecir si un sujeto es o no es susceptible a desarrollar una respuesta profiláctica o terapéutica, preferiblemente respuesta inmune, después de tal inmunoterapia. La presente invención se refiere a métodos y composiciones para mejorar la respuesta inmune suscitada *in vivo* por una composición inmunogénica, en particular una vacuna.

Se conocen desde hace mucho tiempo las técnicas tradicionales de vacunación que implican la introducción de un antígeno (por ejemplo péptidos, proteínas) que puede inducir una respuesta inmune en un sistema animal, y por lo tanto proteger dicho animal por ejemplo contra las infecciones. Estas técnicas han incluido adicionalmente el desarrollo de vacunas tanto vivas como inactivadas. Las vacunas vivas son típicamente versiones no patogénicas atenuadas de un agente infeccioso que son capaces de provocar una respuesta inmune dirigida contra una versión patogénica del agente infeccioso.

En años recientes se han producido avances en el desarrollo de vacunas recombinantes, especialmente vacunas vivas recombinantes, en las que los xenoantígenos de interés se codifican y se expresan a partir de un vector. Entre estos, los vectores basados en virus recombinantes se han observado prometedores y cumplen una importante función en el desarrollo de nuevas vacunas. Se han ensayado muchos virus para investigar su capacidad para expresar proteínas a partir de patógenos externos o tejido de tumor, e inducir respuestas inmunológicas específicas contra estos antígenos *in vivo*. Generalmente, estas vacunas basadas en genes pueden estimular potentes respuestas inmunes humorales y celulares y los vectores víricos pueden ser una estrategia efectiva tanto para suministrar genes que codifican antígenos y como para facilitar y mejorar la presentación de antígenos. Con el fin de ser utilizado como vehículo de vacuna, el vector vírico ideal debe ser seguro y permitir la presentación eficiente de los antígenos específicos del patógeno requerido para el sistema inmune. Adicionalmente, el sistema vector debe cumplir con los criterios que permiten su producción a gran escala. Así, han surgido hasta la fecha varios vectores de vacuna víricos, todos ellos con relativas ventajas y limitaciones dependiendo de la aplicación propuesta (para una revisión sobre las vacunas víricas recombinantes véase por ejemplo Harrop y Carroll, 2006, *Front Biosci.*, 11, 804-817 ; Yokoyama et al., 1997, *J Vet Med Sci.*, 59, 20 311-322) .

Después de observar en la década de los 90, que los vectores de ADN de plásmido podían transfectar directamente células animales *in vivo*, también se han realizado esfuerzos de investigación significativos para desarrollar técnicas de vacunación basadas en el uso de plásmidos de ADN para inducir respuesta inmune, mediante introducción directa en animales del ADN que codifica antígenos. Tales técnicas, que se denominan de modo general vacunación con ADN, se han utilizado para suscitar respuestas inmunes protectoras en un gran número de modelos de enfermedad. Para una revisión sobre las vacunas de ADN, véase Reyes-Sandoval y Ertl, 2001 (*Current Molecular Medicine*, 1, 217-243).

Sin embargo, un problema general en el campo de las vacunas ha sido la identificación de un medio para inducir una respuesta inmune suficientemente fuerte en los individuos vacunados para protegerlos contra la infección y la enfermedad.

Así, por ejemplo, se ha puesto mayor empeño en los últimos años, en descubrir nuevos fármacos que actúen estimulando ciertos aspectos fundamentales del sistema inmune, lo que servirá para incrementar la respuesta inmune inducida por las vacunas. La mayor parte de estos compuestos, denominados modificadores de la respuesta inmune (IRM, por sus siglas en inglés) o adyuvantes, parecen actuar a través de los mecanismos básicos del sistema inmune a través de receptores similares a Toll (TLR, por sus siglas en inglés) para inducir la biosíntesis de diversas citocinas importantes (por ejemplo, interferones, interleucinas, factor de necrosis de tumor, etc. véase por ejemplo Schiller et al., 2006, *Exp Dermatol.*, 15, 331-341). Se ha observado que tales compuestos estimulan una liberación rápida de ciertas citocinas por parte de células dendríticas, monocitos/macrófagos y también son capaces de estimular a las células B a secretar anticuerpos que desempeñan una función importante en las actividades antivíricas y antitumorales de compuestos IRM.

Alternativamente, se han propuesto estrategias de vacunación, la mayoría de ellas basadas en un régimen de vacunación de sensibilización-refuerzo. De acuerdo con estos protocolos de vacunación de "sensibilización-refuerzo", primero se induce el sistema inmune al administrar al paciente una composición sensibilizadora y luego se refuerza mediante la administración de una segunda composición de refuerzo. (Véase por ejemplo EP1411974 o US20030191076).

Adicionalmente, cada miembro de una población puede no ser igualmente sensible a un tratamiento particular. Por ejemplo, los nuevos compuestos fallan frecuentemente en los ensayos clínicos tardíos debido a la falta de eficacia en la población ensayada. Aunque tales compuestos pueden no ser efectivos en la población general, puede haber subpoblaciones sensibles a los compuestos que han fallado debido a varias razones, incluyéndose las diferencias inherentes en la expresión del gen. Así, identificando una subpoblación de pacientes sensibles a un compuesto, es

posible definir el método que se puede utilizar para rescatar los compuestos que han fallado. Los ensayos clínicos posteriores restringidos a una subpoblación de pacientes sensibles pueden después demostrar eficacia de un compuesto que previamente ha fallado dentro de esta subpoblación de pacientes particular, progresando el compuesto hacia su aprobación para uso en esta subpoblación. De acuerdo con lo anterior, otra forma de mejorar la eficacia de la inmunoterapia puede ser determinar la población de pacientes sensibles a dicha terapia.

La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1 o CD54) es una molécula relacionada con la adhesión que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Esta molécula se encuentra en la membrana celular de las células endoteliales. Cuando se activa, el ICAM-1 permite la adhesión estable de leucocitos en la superficie endotelial. Inicialmente, se ha observado que la estructura primaria del ICAM-1 tiene un segmento transmembrana hidrófobo típico y es una molécula insoluble que se solubiliza de las membranas celulares al lisar las células en un detergente no iónico (véase EP0289949). Los estudios posteriores han identificado una especie molecular alternativa de ICAM-1 designada sICAM-1 (o sCD54) que es soluble si la adición de un detergente (véase US5821341). La molécula de adhesión intercelular soluble 1 (sICAM-1) representa una forma circulante de ICAM-1 que se expresa constitutivamente o es inducible en la superficie celular de diferentes estirpes celulares. Se ha encontrado ICAM-1 soluble en fluidos corporales tales como suero, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, esputo, orina y fluido de lavado broncoalveolar. La liberación del ICAM-1 soluble es modulada por varias citocinas y varios factores (alfa TNF, interleucinas, interferones, etc.). Aunque el papel y las funciones de ICAM-1 soluble no se han dilucidado completamente, la evidencia sugiere su implicación en el avance de alguna enfermedad (por ejemplo aterosclerosis e inflamación, Hulthe et al, 2002, Clin Sci (Lond), 103, 123-9). Se ha propuesto que sus niveles elevados al menos pueden informar al especialista acerca de los procesos patológicos.

Véase por ejemplo:

El documento US20060199239 describe un método para evaluar la salud cardíaca en un paciente, por medición de los factores de riesgo de inflamación que incluyen el nivel de ICAM-1 (nivel de enfermedad que se definió anteriormente 285.2 ng/ml).

Molla et al. (1989, J Biol Chem., 264, 10589-94) sugieren que los niveles de sICAM-1 son útiles como índices de manifestaciones clínicas de aterosclerosis.

Dong Soon Kim et al. (1999, Chest, 115, 1059-1065) sugieren utilizar el valor del nivel de ICAM-1 soluble como un marcador de actividad en sarcoidosis ya que, en pacientes con enfermedad activa, los niveles de sICAM-1 en el suero ( $575 \pm 221$  ng/mL) son más elevados que en pacientes con enfermedad inactiva.

Demerath et al. (2001, Ann Hum Biol., 28, 664-78) han observado que la concentración de sICAM-1 y sESEL soluble, refleja el nivel de factores de riesgo de CVD establecidos en mujeres y hombre aparentemente saludables, sumándose a la evidencia de que estos factores contribuyen a CVD a través de sus efectos inflamatorios sobre el endotelio vascular.

Véase también Witkowska et al., 2004, Eur Cytokine Netw., 15, 91-98, que proporciona la concentración de sICAM-1 en los fluidos corporales en varias enfermedades.

Hay estudios que indican que los niveles elevados de ICAM soluble y VCAM se relacionan con la actividad de la enfermedad en pacientes con varias enfermedades inflamatorias crónicas y agudas (Ilic et al, 2007, Med Pregl., 60 Suppl 2,128-32).

Dowlati et al., 2008, Clin. Cancer Res., 14, 1407-1412, han indicado recientemente que los niveles de ICAM son pronósticos de supervivencia y predictivos de la respuesta a la quimioterapia (es decir, carboplatino + paclitaxel) .

Zoumpos et al., 2005, Eur. J. Cancer, Suppl. 3(2), 250-251 dieron a conocer que los niveles de ICAM-1 en orina pueden predecir la respuesta en cáncer superficial de vejiga tratado con inmunoterapia intravesical.

Passalacqua et al., 1998, J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 8(2), 123-124 describen que la eficacia de la inmunoterapia específica puede ser vigilada midiendo el nivel sérico de ICAM-1 durante el tratamiento.

La presente invención se refiere a un método ex- vivo para ensayar si un sujeto responderá terapéuticamente a un método de tratamiento que comprende la administración de una composición inmunogénica, en donde el método de ensayo comprende la etapa de medir los niveles de sICAM-1 en una muestra de sangre de dicho paciente antes de la administración de dicha composición inmunogénica, en donde los bajos niveles de sICAM-1 indican que el sujeto desarrollará una respuesta profiláctica o terapéutica, preferiblemente una respuesta inmune profiláctica o terapéutica hacia la composición inmunogénica con bajos niveles de sICAM-1 que son menores que 300 ng/ml, y en donde dicha composición inmunogénica contiene todo o parte de al menos un antígeno diana o al menos un vector recombinante que expresa in vivo todo o parte de al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica todo o parte de al menos un antígeno diana.

Como se utiliza aquí en toda la solicitud, la expresión "un" y "una" se utilizan en el sentido de que significan "al menos uno", "al menos un primero", "uno o más" o "una pluralidad" de los compuestos o etapas referenciadas, a

menos que el contexto dicte otra cosa. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células que incluyen una mezcla de las mismas. Más específicamente, "al menos uno" y "uno o más" significa un número que es uno o mayor que uno, con una especial preferencia por uno, dos o tres.

5 El término "y/o" donde sea que se utilice aquí incluye el significado de "y", de "o" y de "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

El término "alrededor de" o "aproximadamente" como se utiliza aquí significa con un margen de 20%, preferiblemente con un margen de 10%, y más preferiblemente con un margen de 5%.

10 La expresión "paciente", "sujeto" se refieren a un vertebrado, particularmente un miembro de las especies de mamífero e incluye, pero no se limita a, animales de uso doméstico, animales de uso deportivo, o primates incluyendo seres humanos.

15 De acuerdo con realizaciones especiales, la expresión "un paciente será o es susceptible a responder terapéuticamente" significa que en dicho paciente, después de la administración de una composición inmunogénica, se suscita una respuesta inmune (es decir la respuesta inmune suscitada). De acuerdo con realizaciones preferidas, la expresión "un paciente será o es susceptible a responder terapéuticamente" significa que dicho paciente tiene un incremento del índice de supervivencia (véase sección de ejemplos).

20 De acuerdo con la invención, se observa un incremento del índice de supervivencia comparando el tratamiento de la presente invención con el tratamiento de referencia, es decir sin selección del paciente en base a los niveles sICAM-1. En la realización preferida, se observa un incremento del índice de supervivencia cuando el paciente tratado aún está vivo después de 5 años, 2 años, 12 meses, 8 meses, 6 meses, 1 mes después del tratamiento de acuerdo con la invención.

25 Como se utiliza aquí, el término "tratamiento" o "tratar" abarca la profilaxis y/o terapia. De acuerdo con lo anterior, las combinaciones inmunogénicas o los métodos de la presente invención no se limitan a aplicaciones terapéuticas y se pueden utilizar en profilaxis. Esto está cubierto por el término "para desarrollar una respuesta profiláctica o terapéutica, preferiblemente una respuesta inmune," aquí. "Profilaxis" no se limita a prevenir enfermedades inmediatas (por ejemplo enfermedades infecciosas), sino que abarca adicionalmente la prevención de consecuencias a largo plazo de estas infecciones, tales como cirrosis o cáncer.

30 Una "cantidad efectiva" o una "cantidad suficiente" de un compuesto activo es una cantidad suficiente para producir resultados deseados o beneficiosos, entre los que se incluyen los resultados clínicos. Una cantidad efectiva se puede administrar en una o más administraciones. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad que produce resultados clínicos beneficiosos, que incluyen, pero no se limitan a, alivio de uno o más síntomas asociados con la progresión de un tumor o con una infección vírica, así como con la prevención de enfermedad (por ejemplo, con la prevención de uno o más síntomas asociados a cáncer o infección), estimulación/inducción/aumento del sistema inmune de un sujeto para aliviar una afección presente o proteger contra o reducir daños o infecciones presentes o futuras (incluyendo infecciones víricas, bacterianas, parasitarias), por ejemplo, reducir la proliferación o supervivencia de células neoplásicas, reducir la replicación o difusión de patógenos en un sujeto o reducir detectablemente uno o más síntomas no deseados asociados con una afección, o prolongar la supervivencia de los pacientes.

Como se utilizan aquí, la expresión "sICAM-1" o sCD54 significan molécula 1 de adhesión intercelular soluble y representa una forma circulante de ICAM-1. Se puede utilizar indistintamente el término sICAM-1 o sCD54.

40 De acuerdo con la invención, los niveles de sICAM-1 se pueden determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo los materiales y métodos de la presente invención se pueden utilizar con tecnología Luminex (Luminex Corporation, Austin, Tex.) o con ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA, numerosos kits ELISA están disponibles en el mercado, por ejemplo los de CliniScience, Diaclone, Biosource).

45 De acuerdo con la invención, se pueden determinar los niveles de sICAM-1 en muestras de sangre completa o en plasma o suero. De acuerdo con lo anterior, se debe entender que "obtener una muestra de sangre del sujeto" incluye el tratamiento adicional de dicha muestra de sangre si se ha de medir el nivel de sICAM-1 en plasma o suero.

De acuerdo con una realización de la invención, el nivel de sICAM-1 se determina utilizando anticuerpos.

De acuerdo con una realización específica de la invención, dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

50 De acuerdo con una realización específica de la invención, dichos anticuerpos se etiquetan por ejemplo mediante fluorescencia, radiomarcado, enzima, biotina, u otros métodos designados para presentar sICAM-1 marcado con dichos anticuerpos detectables. Estas técnicas se utilizan ampliamente y se conocen en la técnica.

Los anticuerpos anti-CD54, especialmente anticuerpos monoclonales están ampliamente disponibles en el comercio. Véase por ejemplo el anticuerpo 3H1547 de Anticorps-enligne.fr, el anticuerpo 5540-P (Biocytex).

La expresión "bajos niveles de sICAM-1" significa niveles menores que aproximadamente 300 ng/ml, preferiblemente menores que aproximadamente 250 ng/ml, más preferiblemente menores que aproximadamente 224 ng/ml y aún preferiblemente menores que aproximadamente 200 ng/ml. Dicho nivel se puede medir mediante el perfil de proteínas de plasma Multi-análito utilizando el sistema Luminex® (es decir Luminex® xMAP™ technology, R&D Systems).

Como se utiliza aquí, las expresiones "composición inmunogénica" "composición de vacuna", "vacuna" o términos similares se pueden utilizar indistintamente y significan un agente adecuado para estimular/inducir/incrementar el sistema inmune de un sujeto para mejorar una afección actual o para proteger contra o para reducir daños o infecciones en el presente o el futuro (incluyendo infecciones víricas, bacterianas, parasitarias), por ejemplo, reducir la proliferación o supervivencia de células tumorales, reducir la replicación o propagación de patógenos en un sujeto o reducir de forma detectable uno o más síntomas no deseados asociados con una afección, prolongar la supervivencia del paciente. Dicha composición inmunogénica puede contener (i) todo o parte de al menos un antígeno objetivo y/o (ii) al menos un vector recombinante que expresa *in vivo* todo o parte de al menos una secuencia nucleotídica heteróloga, especialmente una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica todo o parte de al menos un antígeno objetivo. De acuerdo con una realización preferida, la composición inmunogénica de la invención comprende además (iii) al menos un modificador de respuesta inmune, en solitario o en combinación con (i) y/o (ii). Ejemplos de tales modificadores de respuesta inmune (IRM), incluyen los oligonucleótidos CpG (véanse documentos US 6,194,388; US2006094683; WO 2004039829 por ejemplo), lipopolisacáridos, complejos de ácido poliínosico:policitidílico (Kadowaki, et al., 2001, J. Immunol. 166, 2291-2295), y polipéptidos y proteínas conocidas por inducir la producción de citocina a partir de células dendríticas y/o monocitos/macrófagos. Otros ejemplos de tales modificadores de respuesta inmune (IRM) son moléculas orgánicas pequeñas tales como imidazoquinolinaminas, imidazopiridinaminas, 6,7-cicloalquilimidazopiridinaminas condensadas, imidazonaftiridinaminas, oxazoloquinolinaminas, tiazoloquinolinaminas y 1,2-imidazoquinolinaminas puenteadas (véase por ejemplo US 4,689,338; US 5,389,640; US 6,110,929; y US 6,331,539) .

Como se utiliza aquí, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia, incluido un antígeno complejo (por ejemplo células de tumor, células infectadas con virus, etc.), que es capaz de ser el objetivo de una respuesta inmune. Un antígeno puede ser el objetivo de, por ejemplo, una respuesta inmune celular y/o humoral evocada por un paciente. El término "antígeno" abarca por ejemplo todo o parte de los antígenos víricos, antígenos relacionados con tumores o específicos de tumores, antígenos bacterianos, antígenos parasitarios, alérgenos y similares:

- los antígenos víricos incluyen por ejemplo antígenos de los virus de hepatitis A, B, C, D y E, VIH, virus herpes, citomegalovirus, varicela zoster, virus de papiloma, virus Epstein Barr, virus de influenza, virus parainfluenza, adenovirus, virus coxsackie, picornavirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus de la viruela, rinovirus, virus de la rubeola, papovirus, virus de las paperas, virus del sarampión; algunos ejemplos no limitantes de los antígenos víricos conocidos incluyen los siguientes: antígenos obtenidos a partir de VIH-1 tal como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev o parte y/o combinaciones de los mismos; antígenos obtenidos a partir del virus herpes humano tal como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o parte y/o combinaciones de los mismos o la proteína Temprana Inmediata tal como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de HSV1 o HSV2; antígenos obtenidos a partir de citomegalovirus, especialmente citomegalovirus humanos tal como gB o obtenidos a partir de los mismos; antígenos obtenidos a partir del virus Epstein Barr tal como gp350 o obtenidos a partir de los mismos; antígenos obtenidos a partir de Virus de Varicela Zoster tal como gpl, 11, 111 y IE63; antígenos obtenidos a partir de un virus de la hepatitis tal como el antígeno del virus de la hepatitis B, hepatitis C o hepatitis E (por ejemplo proteína env E1 o E2, proteína del núcleo, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7, o parte y/o combinaciones de los mismos de HCV); antígenos obtenidos a partir de virus de papiloma humano (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, por ejemplo L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, o parte y/o combinaciones de los mismos); antígenos obtenidos a partir de otros patógenos víricos, como el virus Sincitial Respiratorio (por ejemplo proteínas F y G o obtenidos a partir de los mismos), virus de parainfluenza, virus de sarampión, virus de paperas, flavivirus (por ejemplo Virus de la Fiebre Amarilla, Virus del Dengue, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, Virus de Encefalitis Japonés) o células del virus de la Influenza (por ejemplo proteínas HA, NP, NA, o M, o parte y/o combinaciones de los mismos);

- los antígenos específicos de tumores o relacionados con tumores incluyen pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, tumor hepático, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, melanoma maligno, cáncer de laringe, cáncer de próstata. Los antígenos son antígenos que pueden estimular potencialmente las respuestas inmunes específicas de tumor que estimulan evidentemente potencialmente. Algunos de estos antígenos se codifican, aunque no se expresan necesariamente, mediante células normales. Estos antígenos se pueden caracterizar como aquellos que son normalmente inactivos (es decir, no se expresan) en células normales, aquellos que se expresan solo en bajos niveles o en ciertas etapas de diferenciación y aquellos que se expresan temporalmente tal como antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos de cáncer se codifican mediante genes celulares mutantes, tal como oncogenes (por ejemplo, oncogen ras activado), genes supresores (por ejemplo, p53 mutante), proteínas de fusión que resultan de supresión internas o translocaciones cromosómicas. Todavía otros antígenos de cáncer se

pueden codificar por genes víricos tal como aquellos llevados en virus de tumor de ARN y ADN. Algunos ejemplos no limitantes de antígeno relacionados o específicos de tumor incluyen MART- 1/Melan-A, gp100, Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), adenosina desaminasa- proteína de unión (ADAbp), ciclofilina b, antígeno asociado Colorectal (CRC) -C017-1A/GA733, Antígeno Embriogénico de Carcinoma (CEA) y sus epítomos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etvβ, amll, Antígeno Específico de Próstata (PSA) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor de Célula T/cadena CD3-zeta, familia MAGE de antígenos de tumor (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), la familia GAGE de antígenos de tumor (por ejemplo, GAGE- 1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-β, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC (por ejemplo MUC-I), HER2/neu, p21ras, RCAS1, alfa-fetoproteína, E-cadherina, alfa-catenina, beta- catenina y gama-catenina, pl20ctn, gp100. sup. Pmell17 , FRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína adenomatosa poliposis coli (APC), fodrin, Conexina 37, Ig-idiotipo, pl5, gp75, gangliosidas GM2 y GD2, productos víricos tal como proteínas del virus de papiloma humano, familia Smad de antígenos de tumor, Imp-1, PIA, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, foforilasa glicogen de cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40) , SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2;

- los antígenos bacterianos incluyen por ejemplo antígenos de Micobacterias que causan TB y lepra, neumococo, bacilos gram negativos aeróbicos, micoplasma, infecciones por estafilococos, infecciones por estreptococos, salmonela, clamidia, neisseriae;

- otros antígenos incluyen por ejemplo antígenos de malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, toxoplasmosis, esquistosomiasis, filariasis;

- los alérgenos se refieren a una sustancia que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir polen, venenos de insectos, polvo de caspa de animales, esporas de hongo y fármacos (por ejemplo penicilina) . Ejemplos de alérgenos naturales, de animal y de planta incluyen pero no se limitan a proteínas específicas para los siguientes géneros: Caninos (*Canis familiaris*); Dermatofagoides (por ejemplo *Dermatophagoides farinae*); Felinos (*Felis domesticus*); Ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*); Lolio (por ejemplo *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); Criptomera (*Cryptomeria japonica*); Alternaria (*Alternaria alternata*); Alder; Aliso (*Alnus glutinosa*); Abedul (*Betula verrucosa*); Roble Blanco Americano (*Quercus alba*); Olivo (*Olea europaea*); Altamisa (*Artemisia vulgaris*); Llantén (por ejemplo *Plantago lanceolata*); Albahaca de río (por ejemplo *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); Cucaracha rubia (por ejemplo *Blattella germanica*); Abejas (por ejemplo *Apis mellifera*); Cipreses (por ejemplo *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); Enebro (por ejemplo *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); Danica (por ejemplo *Thuja orientalis*); Falso ciprés (por ejemplo *Chamaecyparis obtusa*); Cucaracha (por ejemplo *Periplaneta americana*); Grama (por ejemplo *Agropyron repens*); Centeno (por ejemplo *Secale cereale*); Trigo (por ejemplo *Triticum aestivum*); Pasto ovillo (por ejemplo *Dactylis glomerata*); Cañuela alta (por ejemplo *Festuca elatior*); Pasto azul (por ejemplo *Poa pratensis* o *Poa compressa*); Avena (por ejemplo *Avena sativa*); Capín Lanudo (por ejemplo *Holcus lanatus*); Grama de olor (por ejemplo *Anthoxanthum odoratum*); Avena descollada (por ejemplo *Arrhenatherum elatius*); heno ahumado (por ejemplo *Agrostis alba*); Bohordillos (por ejemplo *Phleum pratense*); hierba cinta (por ejemplo *Phalaris arundinacea*); Grama dulce (por ejemplo *Paspalum notatum*); Sorgo (por ejemplo *Sorghum halepensis*); y Bromo inerme (por ejemplo *Bromus inermis*).

De acuerdo con una realización especial, dicho antígeno es codificado por una secuencia nucleotídica heteróloga y expresado *in vivo* por un vector recombinante.

En una realización particularmente preferida la secuencia nucleotídica heteróloga de la presente invención, codifica uno o más de todos o parte de los siguientes antígenos HBV-PreS1 PreS2 y proteínas env de Superficie, núcleo y polVIH- gp120 gp40, gp160, p24, gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat, rev, nef; HPV-E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, L1, L2 (véase por ejemplo WO 90/10459, WO 98/04705, WO 99/03885); HCV env de proteína E1 o E2, proteína de núcleo, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7 (véase por ejemplo WO2004111082 , WO2005051420 ); Muc-1 (véase por ejemplo US 5,861,381; US6,054,438; WO98/04727; WO98/37095) .

De acuerdo con las variantes de la invención, la composición inmunogénica contiene al menos dos antígenos, o una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica al menos dos antígenos, o al menos dos secuencias de nucleótido heterólogas que codifican al menos dos antígenos, o cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con otra realización especial, dicha secuencia nucleotídica heteróloga de la presente invención, codifica todo o parte del antígeno HPV seleccionado del grupo que consiste en la región codificada temprana Eβ de HPV, región codificada temprana E7 de HPV y obtenido a partir o combinaciones de los mismos.

El antígeno HPV codificado por el vector recombinante de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido HPV E6, un polipéptido HPV E7 o ambos, un polipéptido HPV E6 y un polipéptido HPV E7. La presente invención abarca el uso de cualquier polipéptido HPV E6 cuya unión a p53 está alterada o al menos significativamente reducida y/o el uso de cualquier polipéptido HPV E7 cuya unión a Rb está alterada o al menos significativamente reducida (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105; Crook et al., 1991, Cell 67, 547- 556; Heck

et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442- 4446; Phelps et al., 1992, J. Virol. 66, 2148-2427). Una variante HPV-16 E6 no oncogénica es adecuada para el propósito de la presente invención se elimina de uno o más restos de aminoácidos ubicados aproximadamente en la posición 118 a aproximadamente la posición 122 (+1 representa el primer residuo de metionina del polipéptido HPV-16 E6 nativo), con una especial preferencia a la supresión completa de los restos 118 a 122 (CPEEK). Una variante HPV-16 E7 no oncogénica que es adecuada para el propósito de la presente invención se suprime de uno o más restos de aminoácido ubicados de aproximadamente la posición 21 a aproximadamente la posición 26 (+1 representa el primer aminoácido del polipéptido nativo HPV-16 E7, con una especial preferencia por la suopresión completa de los restos 21 a 26 (DLYCYE). De acuerdo con una realización preferida, el uno o más polipéptidos tempranos HPV-16 en el uso de la invención se modifican adicionalmente con el fin de mejorar la presentación de MHC de clase I y/o MHC de clase II, y/o para estimular la inmunidad anti-HPV. Los polipéptidos HPV E $\beta$  y E7 son proteínas nucleares y se observado previamente que su presentación a la membrana permite mejorar su eficacia terapéutica (véase por ejemplo WO99/03885). Así, puede ser aconsejable modificar al menos uno de los polipéptidos tempranos de HPV con el fin de ser anclado a la membrana celular. El anclaje a la membrana se puede lograr fácilmente incorporando en el polipéptido temprano de HPV una secuencia de anclaje a membrana y, si el polipéptido nativo carece de ella, una secuencia secretora (es decir un péptido de señal). Se conocen en la técnica las secuencias secretoras y de anclaje a la membrana. En resumen, las secuencias secretoras están presentes en el terminal N de los polipéptidos presentados a la membrana o secretados e inician su paso al retículo endoplásmico (ER). Normalmente comprenden de 15 a 35 aminoácidos esencialmente hidrófobos que luego son separados por una endopeptidasa específica localizada en el ER para dar el polipéptido maduro. Normalmente, las secuencias de anclaje a la membrana son altamente hidrófobas por naturaleza y sirven para anclar los polipéptidos en la membrana celular (véase por ejemplo Branden and Tooze, 1991, en Introduction to Protein Structure p. 202-214, NY Garland).

Es vasta la elección de las secuencias de anclaje a la membrana y secretoras que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención. Se pueden obtener a partir de cualquier polipéptido anclado a la membrana y/o secretado que la comprenda (por ejemplo polipéptidos celulares o víricos) tal como la glicoproteína de la rabia, la glicoproteína de la envoltura del virus VIH o la proteína del virus F de las paperas, o pueden ser sintéticos. Las secuencias de anclaje a la membrana y/o secretoras insertadas en cada uno de los polipéptidos tempranos HPV-16 utilizados de acuerdo con la invención pueden tener un origen diferente o común. El sitio preferido para la inserción de la secuencia secretora es el terminal N secuencia abajo del codón para el inicio de la traducción y para la inserción de la secuencia anclada a la membrana es el terminal C, por ejemplo inmediatamente secuencia arriba del codón de parada.

El polipéptido HPV E6 en uso en la presente invención se modifica preferiblemente mediante la inserción de las señales de anclaje a la membrana y secretoras de la proteína F de paperas. Opcionalmente o en combinación, el polipéptido HPV E7 en uso en la presente invención se modifica preferiblemente mediante la inserción de las señales de anclaje a la membrana y secretoras de la glicoproteína de rabia.

La eficacia terapéutica del vector recombinante también se puede mejorar utilizando uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos inmunopotenciadores. Por ejemplo, puede ser ventajoso enlazar el o los polipéptidos tempranos de HPV a un polipéptido tal como calreticulina (Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108, 669-678), proteína 70 de choque por calor de tuberculosis *Micobacterium* (HSP70) (Chen et al., 2000, cáncer Res. 60, 1035- 1042), ubiquitina (Rodríguez et al. , 1997, J. Virol. 71, 8497- 8503) o el dominio de translocación de una toxina bacteriana tal como exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* A (ETA(dII)) (Hung et al., 2001 Cancer Res. 61, 3698-3703).

De acuerdo con otra realización, el vector recombinante de acuerdo con la invención comprende uno o más polipéptidos tempranos que codifican un ácido nucleico como se definió anteriormente, y más particularmente los polipéptidos tempranos de HPV-16 y/o HPV-18 E6 y/o E7.

De acuerdo con otra realización especial y preferida, dicha secuencia nucleotídica heteróloga de la presente invención codifica todo o parte del antígeno MUC 1 o sus obtenido a partir.

De acuerdo con otra realización especial, dicha secuencia nucleotídica heteróloga de la presente invención, codifica uno o más de todo o parte de los siguientes: proteína E1 o E2 de HCV env, proteína del núcleo, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7 o obtenido a partir de los mismos. De acuerdo con otra realización especial, dicha secuencia nucleotídica heteróloga de la presente invención, codifica una o más proteínas de fusión en donde la configuración no es nativa en el sentido que al menos uno de los polipéptidos NS aparecen en un orden que es distinto de aquel de la configuración nativa. Así, si la proteína de fusión comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4A y un polipéptido NS5B, la configuración nativa sería NS3-NS4A-NS5B con NS3 en el terminal N y NS5B en el terminal C. En cambio, una configuración no nativa puede ser NS5B-NS3-NS4A, NS5B-NS4A-NS3, NS4A-NS3-NS5B, NS4A-NS5B-NS3 o NS3-NS5B-NS4A. En particular, la proteína de fusión de acuerdo con la invención comprende al menos uno de los siguientes:

- un polipéptido NS4A fusionado directamente o a través de un enlazador en el terminal N de un polipéptido NS3;

○ un polipéptido NS3 fusionado directamente o a través de un enlazador en el terminal N de un polipéptido NS5B;

○ un polipéptido NS4B fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal N de un polipéptido NS5B;

5 ○ un polipéptido NS4A fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal N de un polipéptido NS3 que está fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal N de un polipéptido NS4B; y/o

○ un polipéptido NS3 fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal N de un polipéptido NS4B que está fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal N de un polipéptido NS5B.

10 En tales porciones específicas de la proteína de fusión de la invención, cada uno de los polipéptidos NS puede ser independientemente nativo o modificado. Por ejemplo, el polipéptido NS4A incluido en la porción NS4A-NS3 puede ser nativo mientras que el polipéptido NS3 comprende al menos una de las modificaciones descritas adelante.

15 Si se necesita, la molécula de ácido nucleico en el uso en la invención se puede optimizar para proporcionar alto nivel de expresión del antígeno objetivo (por ejemplo uno o más polipéptidos tempranos de HPV en un organismo o célula anfitriona particular, por ejemplo un organismo o célula anfitriona humana. Típicamente, la optimización del codón se desarrolla reemplazando uno o más codones "nativos" (por ejemplo HPV) que corresponden a un codón infrecuentemente utilizado en la célula anfitriona de mamífero por uno o más codones que codifican el mismo aminoácido que se utiliza más frecuentemente. Esto se puede lograr mediante mutagénesis convencional o mediante técnicas sintéticas químicas (por ejemplo, que dan como resultado un ácido nucleico sintético). No es necesario reemplazar todos los codones nativos que corresponden a codones infrecuentemente utilizados ya que se puede lograr expresión incrementada aún con reemplazo parcial. Más aún, se pueden hacer algunas desviaciones de adherencia estricta al uso de codones optimizados para acomodar la introducción de uno o más sitios de restricción.

25 Como se utiliza aquí, el término "vector recombinante" se refiere a un vector vírico así como a vectores no víricos, incluidos los vectores extracromosómicos (por ejemplo, episomas), multicopia e integrativos (es decir, para ser incorporados en los cromosomas anfitriones). Son particularmente importantes en el contexto de la invención los vectores para uso en terapia génica (es decir que son capaces de suministrar el ácido nucleico a un organismo anfitrión) así como los vectores de expresión para uso en varios sistemas de expresión. Los vectores no víricos adecuados incluyen plásmidos tales como pREP4, pCEP4 (Invitrogene), pCI (Promega), pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840), pVAX y pgWiz (Gene Therapy System Inc; Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76, 12735-12746). Los vectores víricos adecuados se pueden derivar de una gama de diferentes virus (por ejemplo retrovirus, adenovirus, AAV, virus de viruela, virus herpes, virus de paperas, espumavirus y similares). Como se utiliza aquí, el término "vector vírico" abarca vector de ADN/ARN así como partículas víricas generadas a partir de los mismos. Los vectores víricos pueden ser competentes en capacidad replicativa, o pueden estar genéticamente incapacitados de modo que son defectuosos en capacidad replicativa o replicativamente deteriorados. El término "competentes en capacidad replicativa" como se utiliza aquí abarca vectores víricos condicionalmente replicativos o replicativamente selectivos que se construyen por ingeniería para replicarse mejor o selectivamente en células anfitrionas específicas (por ejemplo células tumorales).

35 En un aspecto, el vector recombinante en el uso en la invención es un vector adenoviral recombinante (para una revisión, véase "Adenoviral vectors for gene therapy", 2002, Ed D. Curiel y J. Douglas, Academic Press). Este se puede obtener a partir de diversas fuentes humanas o animales y cualquier serotipo de los serotipos de adenovirus 1 a 51 puede ser empleado. Particularmente se prefieren los adenovirus humanos 2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Adβ), 11 (AdII), 24 (Ad24) y 35 (Ad35). Tales adenovirus están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.), y han sido objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, organización y métodos de producción, que permiten al experto en la técnica aplicarlos (véase por ejemplo US 6,133,028; US 6,110,735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; Vogels et al., 2003, J. Virol. 77, 8263-8271).

45 El vector adenoviral en uso en la presente invención puede ser competente en capacidad replicativa. Numerosos ejemplos de vectores adenovirales competentes en capacidad replicativa están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Hernandez-Alcoceba et al., 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis et al., 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727). Por ejemplo, se pueden construir por ingeniería genética a partir de un genoma de adenovirus tipo natural por supresión en el dominio CR2 de E1A (véase por ejemplo WO00/24408) y/o por reemplazo de los promotores E1 y/o E4 nativos por promotores específicos de estado de tejido, célula o tumor (véase por ejemplo US 5,998,205, WO99/25860, US 5,698,443, WO00/46355, WO00/15820 y WO01/36650).

55 Alternativamente, el vector adenoviral en uso en la invención es defectuoso en capacidad replicativa (véase por ejemplo WO94/28152; Lusky et al., 1998, J. Virol 72, 2022-2032). Los vectores adenovirales defectuosos en capacidad replicativa preferidos son defectuosos en E1 (véase por ejemplo US 6,136,594 y US 6,013,638), con una supresión de E1 que se extiende desde aproximadamente las posiciones 459 a 3328 o desde aproximadamente las posiciones 459 a 3510 (por referencia a la secuencia del tipo de adenovirus humano descrito en el GeneBank bajo el

número de acceso M 73260 y en Chroboczek et al., 1992, *Virology* 186, 280-285). La capacidad de clonación se puede mejorar adicionalmente suprimiendo las porciones adicionales del genoma adenoviral (todo o parte de la región E3 no esencial o de otras regiones E2, E4 esenciales). La inserción de un ácido nucleico en cualquier ubicación del vector adenoviral se puede realizar a través de recombinación homóloga como se describe en Chartier et al. (1996, *J. Virology* 70, 4805-4810). Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido HPV-16 E6 se puede insertar en sustitución de la región E1 y el ácido nucleico que codifica el polipéptido HPV-16 E7 en sustitución de la región E3 o viceversa.

En otro aspecto además preferido, el vector en uso en la invención es un vector de virus de viruela (véase por ejemplo Cox et al. in "Viruses in Human Gene Therapy" Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press). De acuerdo con otra realización preferida se selecciona del grupo que consiste en virus de vacuna, los virus de vacuna adecuados incluyen sin limitación la cepa Copenhagen (Goebel et al., 1990, *Virology* 179, 247-266 y 517-563; Johnson et al., 1993, *Virology* 196, 381-401), la cepa Wyeth y el virus altamente atenuado obtenido a partir del mismo, incluido MVA (para revisión véase Mayr, A., et al., 1975, *Infection* 3, 6-14) y obtenido a partir del mismo (tal como la cepa 575 de la vacuna MVA (ECACC W00120707 - US 6,913,752), NYVAC (véase WO 92/15672 - Tartaglia et al., 1992, *Virology* 188, 217-232). La determinación de la secuencia completa del genoma de MVA y la comparación con el genoma de Copenhagen VV ha permitido la identificación precisa de las siete supresiones (I a VII) que ocurrieron en el genoma de MVA (Antoine et al., 1998, *Virology* 244, 365-396), cualquiera de los cuales se puede utilizar para insertar el ácido nucleico que codifica el antígeno. El vector también se puede obtener a partir de cualquier otro miembro del virus de la viruela, en particular viruela aviar (por ejemplo TROVAC, véase Paoletti et al, 1995, *Dev Biol Stand.*, 84, 159-163); viruela de canario (por ejemplo ALVAC, WO 95/27780, Paoletti et al, 1995, *Dev Biol Stand.*, 84, 159-163); viruela de aves; viruela del cerdo y similares. A modo de ejemplo, las personas expertas en la técnica se puede referir a la WO 92 15672 (incorporado como referencia) que describe la producción de los vectores de expresión basados en virus de la viruela capaces de expresar tal secuencia nucleotídica heteróloga, especialmente la secuencia nucleotídica que codifica el antígeno.

La técnica básica para insertar el ácido nucleico y los elementos reguladores asociados requeridos para la expresión en un genoma de virus de la viruela se describe en numerosos documentos accesibles para el experto en la técnica (Paul et al., 2002, *Cancer Gene Ther.* 9, 470-477; Piccini et al., 1987, *Methods of Enzymology* 153, 545-563; US 4,769,330; US 4,772,848; US 4,603,112; US 5,100,587 y US 5,179,993). Habitualmente, se procede a través de recombinación homóloga entre secuencias solapantes (es decir, el sitio de inserción deseado) presentes en el genoma vírico y un plásmido que lleva el ácido nucleico para insertar.

El ácido nucleico que codifica el antígeno de la invención se inserta preferiblemente en un sitio no esencial del genoma el virus de la viruela, con el fin que el virus de la viruela recombinante permanezca viable e infeccioso. Las regiones no esenciales son regiones intergénicas no codificantes o cualquier gen cuya inactivación o supresión no deteriora significativamente el crecimiento vírico, la replicación o la infección. También puede considerarse la inserción en un sitio vírico esencial siempre que se suministre la función defectuosa *in trans* durante la producción de partículas víricas, por ejemplo usando una estirpe celular auxiliar que lleva las secuencias complementarias que corresponden a las suprimidas en el genoma de virus de viruela.

Cuando se utiliza el virus de vacuna Copenhagen, el ácido nucleico que codifica el antígeno se inserta preferiblemente en el gen de timidina quinasa (tk) (Hruby et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80, 3411-3415; Weir et al., 1983, *J. Virology* 46, 530-537). Sin embargo, también son apropiados otros sitios de inserción, por ejemplo, en el gen hemaglutinina (Guo et al., 1989, *J. Virology* 63, 4189-10 4198), en el sitio KIL, en el gen u (Zhou et al., 1990, *J. Gen. Virology* 71, 2185-2190) o en el extremo izquierdo del genoma del virus de vacuna en donde una variedad de supresiones construidas por ingeniería o espontáneas se ha reportado en la literatura (Altenburger et al., 1989, *Archives Virology* 105, 15-27; Moss et al. 1981, *J. Virology* 40, 387-395; Panicali et al., 1981, *J. Virology* 37, 1000-1010; Perkus et al, 1989, *J. Virology* 63, 3829-3836; Perkus et al , 1990, *Virology* 179, 276-286; Perkus et al, 1991, *Virology* 180, 406-410).

Cuando se utiliza MVA, el ácido nucleico que codifica el antígeno se puede insertar en una de las supresiones identificadas I a VII así como en el sitio D4R, pero se prefiere la inserción en la supresión II o III (Meyer et al., 1991, *J. Gen. Virology* 72, 1031-1038; Sutter et al. , 1994, *Vaccine* 12, 1032-1040).

Cuando se utiliza el virus de viruela aviar, aunque se puede considerar la inserción dentro del gen de timidina quinasa, el ácido nucleico que codifica el antígeno se introduce preferiblemente en la región intergénica situada entre los ORF 7 y 9 (véase por ejemplo EP 314 569 y US 5,180,675).

De acuerdo con una realización especial, dicho vector recombinante es un ADN de plásmido recombinante o un vector vírico recombinante.

De acuerdo con otra realización especial, dicho vector vírico recombinante es un vector adenoviral recombinante.

De acuerdo con otra realización especial, dicho vector vírico recombinante es un vector de vacuna recombinante.

De acuerdo con una realización preferida, dicho vector de vacuna recombinante es un vector MVA recombinante.

Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica el antígeno en uso en la invención está en una forma adecuada para su expresión en una célula u organismo anfitrión, lo que significa que la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno se pone bajo el control de una o más secuencias reguladoras necesarias para su expresión en la célula u organismo anfitrión. Como se utiliza aquí, el término "secuencia reguladora" se refiere a cualquier secuencia que permite, contribuye a o modula la expresión de un ácido nucleico en una célula anfitriona dada, lo que incluye la replicación, duplicación, transcripción, división, traducción, estabilidad y/o transporte del ácido nucleico o uno de sus derivados (es decir mRNA) en la célula anfitriona. Se apreciará por los expertos en la técnica que la elección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tal como la célula anfitriona, el vector y el nivel de expresión deseado. El ácido nucleico que codifica el antígeno se enlaza operativamente a una secuencia de expresión del gen que dirige la expresión del ácido nucleico del antígeno dentro de una célula eucariótica. La secuencia de expresión del gen es cualquier secuencia nucleotídica reguladora, tal como una secuencia promotora o una combinación mejorador-promotor, que facilita la transcripción y la traducción eficientes del ácido nucleico del antígeno al cual se une operativamente. La secuencia de expresión del gen, por ejemplo, puede ser un promotor vírico o de mamífero, tal como un promotor inducible o constitutivo. Los promotores de mamífero constitutivos incluyen, pero no se limitan a, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato quinasa, promotor de b-actina y otros promotores constitutivos. Ejemplos de promotores víricos que funcionan constitutivamente en células eucarióticas incluyen, por ejemplo, promotores del citomegalovirus (CMV), virus del simio (por ejemplo, SV40), virus de papiloma, adenovirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de sarcoma Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de leucemia Moloney y otros retrovirus, y el promotor quinasa timidina del virus de herpes simplex. Otros promotores constitutivos son conocidos por los expertos en la técnica. Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la invención también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en la presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor metalotioneina se induce para promover la transcripción y traducción en la presencia de ciertos iones de metal. Otros promotores inducibles son conocidos por las personas medianamente expertas en la técnica. En general, la secuencia de expresión génica debe incluir, según sea necesario, las secuencias de no transcripción 5' y de no traducción 5' implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tal como una caja TATA, secuencia de bloqueo terminal, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, tales secuencias de no transcripción 5' incluirá una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico de antígeno unido operablemente. Las secuencias de expresión génica incluyen opcionalmente las secuencias mejoradoras y las secuencias de activador en la dirección 5' según se desee. Los promotores preferidos para uso en un vector de virus de viruela (véase adelante) incluyen sin limitación promotores de vacuna 7.5K, H5R, TK, p28, pII y KIL, promotores quiméricos entre los promotores de virus de la viruela tempranos y tardíos así como los promotores sintéticos tales como los descritos en Chakrabarti et al. (1997, *Biotechniques* 23, 1094-1097), Hammond et al. (1997, *J. Virological Methods* 66, 135-138) y Kumar y Boyle (1990, *Virology* 179, 151-158).

El promotor tiene especial importancia y la presente invención abarca el uso de promotores constitutivos que dirigen la expresión del ácido nucleico en muchos tipos de las células anfitrionas y aquellos que dirigen la expresión solo en ciertas células anfitrionas o en respuesta a eventos específicos o factores exógenos (por ejemplo mediante temperatura, aditivo de nutrientes, hormona u otro ligando). Los promotores adecuados se describen ampliamente en la literatura y uno puede citar más específicamente los promotores víricos tal como los promotores RSV, SV40, CMV y MLP. Los promotores preferidos para uso en un vector de virus de viruela incluyen sin limitación promotores de vacuna 7.5K, H5R, TK, p28, pII y KIL, promotores quiméricos entre los promotores de virus de la viruela tempranos y tardíos así como los promotores sintéticos tal como aquellos descritos en Chakrabarti et al. (1997, *Biotechniques* 23, 1094-1097), Hammond et al. (1997, *J. Virological Métodos* 66, 135-138) y Kumar y Boyle (1990, *Virology* 179, 151-158). Los expertos en la técnica apreciarán que los elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender adicionalmente elementos adicionales para la iniciación, regulación y/o terminación apropiadas de la transcripción (por ejemplo las secuencias de terminación de transcripción poliA), transporte de mRNA (por ejemplo secuencias de señal de localización nuclear), procesamiento (por ejemplo señales de división), y estabilidad (por ejemplo intrones y las secuencias 5' y 3' no codificantes), traducción (por ejemplo la señal del péptido, propéptido, secuencias tripartitas líderes, sitios de unión a ribosoma, secuencias Shine-Dalgarno, etc.) en la célula u organismo anfitrión.

Alternativamente, el vector recombinante en uso en la presente invención puede comprender adicionalmente al menos un ácido nucleico que codifica al menos una citocina. Las citocinas adecuadas incluyen sin limitación interleucinas (por ejemplo IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21) e interferones (por ejemplo IFN $\gamma$ , INF $\alpha$ ), con una especial preferencia por interleucina IL-2. Cuando la vacuna recombinante de la invención comprende un ácido nucleico que expresa la citocina, dicho ácido nucleico se puede llevar a cabo mediante el vector recombinante que codifica uno o más antígenos (s) o mediante un vector recombinante independiente que puede ser de origen igual o diferente.

De acuerdo con una realización preferida, el vector recombinante en uso en la presente invención codifica todo o parte del antígeno MUC1 y al menos una de las citocinas listadas anteriormente, y preferiblemente una interleucina, especialmente IL2.

Las partículas víricas infecciosas que comprenden el vector recombinante vírico descrito anteriormente se pueden producir mediante procesos de rutina. Un proceso ilustrativo comprende las etapas de:

a. introducir el vector vírico dentro de una estirpe celular adecuada,

- b. cultivar dicha estirpe celular bajo condiciones adecuadas con el fin de permitir la producción de dicha partícula vírica infecciosa,
- c. recuperar la partícula vírica infecciosa producida del cultivo de dicha estirpe celular, y
- d. opcionalmente purificar dicha partícula vírica infecciosa recuperada.

5 Las células apropiadas para propagar los vectores adenovirales son por ejemplo células 293, células PERC6, células HER96, o las células como se describe en WO 94/28152, WO 97/00326, US 6,127,175.

Las células apropiadas para propagar los vectores de virus de la viruela son células de ave, y más preferiblemente fibroblastos de embrión de pollo primarios (CEF) preparados a partir de embriones de pollo de huevos fertilizados.

10 Las partículas víricas infecciosas se pueden recuperar del sobrenadante de cultivo o de las células después de lisis (por ejemplo por medios químicos, congelamiento/descongelamiento, choque osmótico, choque mecánico, sonicación y similares). Las partículas víricas se pueden aislar mediante rondas consecutivas de purificación de colonias y luego purificar usando técnicas conocidas en este campo (métodos cromatográficos, ultracentrifugación en cloruro de cesio o gradiente de sacarosa).

15 Si se desea, el método o uso para tratar una enfermedad humana en un paciente que padece una enfermedad humana (es decir, administrando una composición inmunogénica que comprende al menos un antígeno) se puede llevar a cabo en los pacientes seleccionados en conjunto con una o más modalidades terapéuticas convencionales (por ejemplo radiación, quimioterapia y/o cirugía). El uso de múltiples métodos terapéuticos proporciona al paciente seleccionado una intervención de base más amplia. En una realización, el método o uso para tratar la enfermedad humana en un paciente que padece la enfermedad humana puede ir precedido o seguido de una intervención quirúrgica. En otra realización, puede ir precedido o seguido de radioterapia (por ejemplo, radiación gama). Los expertos en la técnica pueden formular fácilmente los protocolos de terapia de radiación apropiados y los parámetros que se pueden utilizar (véase, por ejemplo, Perez y Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co; utilizando adaptaciones y modificaciones apropiadas que serán fácilmente evidente para los expertos en el campo). En todavía otra realización, el método o uso de la invención va asociado a quimioterapia con uno o más fármacos (por ejemplo fármacos que se utilizan convencionalmente para tratar o evitar las infecciones víricas, afecciones patológicas asociadas con virus, cáncer y similares).

El paciente ensayado en un método de la presente invención puede ser un paciente de cáncer que está siendo sometido a tratamiento quimioterapéutico con un agente quimioterapéutico.

20 De acuerdo con una realización, el paciente recibe dicho agente quimioterapéutico antes de la administración de dicha composición inmunogénica.

De acuerdo con otra realización, el paciente recibe dicho agente quimioterapéutico después de la administración de dicha composición inmunogénica.

De acuerdo con otra realización, el paciente recibe dicho agente quimioterapéutico concomitantemente con la administración de dicha composición inmunogénica.

35 El agente quimioterapéutico o los fármacos citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, Vincristina, Cisplatina, Azaguanina, Etoposido, Adriamicina, Aclarubicina, Mitoxantrona, Mitomicina, Paclitaxel, Gemcitabina, Taxotere, Dexametasona, Ara-C, Metilprednisolona, Metotrexato, Bleomicina, Metil-GAG, Carboplatina, 5-FU (5-Fluorouracilo), MABTHERA™ (Rituximab), radiación, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), y 5-Aza-2'-deoxicidina (Decitabina).

40 Los agentes quimioterapéuticos radioactivos de ejemplo incluyen los compuestos que contienen emisores alfa tales como astatina-211, bismuto-212, bismuto-213, plomo-212, radio-223, actinio-225, y torio-227, emisores beta tal como tritio, estroncio-90, cesio-137, carbono-11, nitrógeno-13, oxígeno-15, flúor-18, hierro-52, cobalto-55, cobalto-60, cobre-61, cobre-62, cobre-64, zinc-62, zinc-63, arsénico-70, arsénico-71, arsénico-74, bromo-76, bromo-79, rubidio-82, itrio-86, zirconio-89, indio-110, yodo-120, yodo-124, yodo-129, yodo-131, yodo-125, xenón-122, tecnecio-94m, tecnecio-94, tecnecio-99m, y tecnecio-99, o emisores gama tales como cobalto-60, cesio-137, y tecnecio-99m. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen anticuerpos tales como Alemtuzumab, Daclizumab, Rituximab (MABTHERA™), Trastuzumab (HERCEPTIN™), Gemtuzumab, Ibrirumomab, Edrecolomab, Tositumomab, CeaVac, Epratuzumab, Mitumomab, Bevacizumab, Cetuximab, Edrecolomab, Lintuzumab, MDX-210, IGN-101, MDX-OIO, MAb, AME ABX-EGF, EMD 72 000, Apolizumab, Labetuzumab, ior-tl, MDX-220, MRA, H-1 1 scFv, Oregovomab, huJ591 MAb, BZL Visilizumab, TriGem, TriAb, R3, MT-201, G-250, no conjugado, ACA-125, Onyvox-105, CDP- 860, BrevaRex MAb AR54, IMC-ICI 1, GliomaMab-H, ING-I, Anti-LCG MAb, MT-103, KSB- 303, Therex, KW- 2871, Anti-HM1.24, Anti-PTHrP, anticuerpo 2C4, SGN-30, TRAIL-RI MAb CAT, anticuerpo para cáncer de Próstata, H22xKi-4, ABX-MAI, Imuteran, y Monofarm-C.

55 Ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen Acivicina; Aclarubicina; Hidrocloruro de Acodazol; Acronina; Adozelesina; Adriamicina; Aldesleucina; Altretarina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona;

Arnmoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramincina; Asparaginasa; Asperlina; Azacidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Hidrocloruro de Bisantrono; Bisnafida Dimesilato; Bizelesina; Bleomicina Sulfato; Brequinar Sodio; Bropirimina; Busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Campotecina; Caracemida; Carbetimer; Carboplatina; Carmustinea; Hidrocloruro de Carubicina; Carzelesin; Cedefingol; Clorambucil;
 5 Cirolemicina; Cisplatina; Cladribina; Combretastatina A-4; Grisonatol Mesilato; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; DACA (N-[2-(Dimetil-amino) etil] acridina-4-carboxamida); Dactinomicina; Hidrocloruro de Daunorubicina; Daunomicina; Decitabina; Dexamplatina; Dezaguanina; Dezaguanina Mesilato; Diaziquona; Docetaxel; Dolasatinas; Doxorubicina; Hidrocloruro de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Hidrocloruro de Eflornitina; Eliptica; Elsamitruccina; Enloplatina;
 10 Enpromato; Epiropidina; Hidrocloruro de Epirubicina; Erbulozol; Hidrocloruro de Esorubicina; Estramustine; Fosfato de Estramustina Sodio; Etanidazol; Aceite de Etiodizado 1 131; Etoposida; Fosfato de Etoposida; Etoprina; Hidrocloruro de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; 5-FdUMP; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sodio; Gemcitabina; Hidrocloruro de Gemcitabina; Gold Au 198; Homocampotecina; Hidroxiurea; Hidrocloruro de Idarubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón
 15 Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-1a; Interferón Gamma-1 b; Interplatin; Hidrocloruro de Irinotecan; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Hidrocloruro de Liarozol; Lometrexol Sodio; Lomustina; Hidrocloruro de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Hidrocloruro de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalan; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sodio; Metoprina; Meturedpa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper;
 20 Mitotana; Hidrocloruro de Mitoxantrona; Ácido Mifofenólico; Nocodazol; Nogalamincina; Ormaplatina; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; PepliocinSulfato; Perfosfamida; Pipobroman; Pipsulfan; Hidrocloruro de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sodio; Porfiriomicina; Prednimustina; Hidrocloruro de Procarbazona; Puomicina; Hidrocloruro de Puomicina; Pirazofurina; Rizoxina; Rizoxina D; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Hidrocloruro de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sodio; Esparsomicina;
 25 Hidrocloruro Espirogermanio; Espiromustina; Espiropatrina; Estreptonigrina; Estreptozocina; cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalan Sodio; Tegafur; Hidrocloruro de Teloxantrona; Temoporina; Teniposida; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Timitaq; Tiazofurina; Tirapazamina; Tomudex; TOP53; Hidrocloruro de Topotecan; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucoronato Trimetrexato; Triptorelin; Hidrocloruro de Tubulozol; Uracil Mustard;
 30 Uredpa; Vapreotida; Verteporfin; Vinblastina; Sulfato de Vinblastina; Vincristina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatina; Zinostatina; Hidrocloruro de Zorubicina; 2-Clorodesoxiadenosina; 2'-Desoxiformicina; 9-aminocampotecina; raltitrexed; ácido N-propargil-5,8-dideazafólico; 2-cloro-2'-arabino-fluoro-2'-desoxiadenosina; 2-cloro-2'-desoxiadenosina; anisomicina; tricostatina A; hPRL-G129R; CEP-751; linomida; mostaza de azufre; mostaza de nitrógeno (meclor etamina); ciclofosfamida;
 35 melfalan; clorambucil; ifosfamida; busulfan; N- metil-Nnitrosourea (MNU); N, N'-Bis(2-cloroetil)-N-nitrosourea (BCNU); N-(2-cloroetil)-N'-ciclohexil-N-nitrosourea (CCNU); N-(2-cloroetil)-N'-(trans-4-metilciclohexil-N-nitrosourea (MeCCNU); N-(2-cloroetil)-N'-(diethyl)etilfosfonato-N-nitrosourea (fotemustina); estreptozotocina; diacarbazina (DTIC); mitozolomida; temozolomida; tiotepa; mitomicina C; AZQ; adozelesina; Cisplatina; Carboplatina; Ormaplatina;
 40 Oxaliplatina; Cl- 973; DWA 2 114R; JM216; JM335; Bis (platino); tomudex; azacidina; citarabina; gemcitabina; 6-Mercaptopurina; 6-Tioguanina; Hipoxantina; teniposida 9- amino campotecina; Topotecan; CPT-II; Doxorubicina; Daunomicina; Epirubicina; darubicina; mitoxantrona; losoxantrona; Dactinomicina (Actinomicina D); amsacrina; pirazoloacridina; retinol todo-trans; 14-hidroxi-retro-retinol; ácido retinoico todo trans; N- (4- Hidroxifenil) retinamida; ácido 13-cis retinoico; 3-Metil TTNEB; ácido 9-cis retinoico; fludarabina (2-F-ara-AMP); o 2-clorodesoxiadenosina (2-Cda).
 45

Otros agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, 20-pi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; yrografolida; inhibidores de angiogenia; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína 1 morfogénica anti-
 50 dorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos anticodificantes; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL- PTBA; argininasaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxina; azatirosina; obtenido a partir bacatina DI; balanol; batimastat; antagonistas BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosoprina; obtenido a partir beta lactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor bFGF;
 55 bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilpermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bleomicina A2; bleomicina B2; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; obtenido a partir campotecina (por ejemplo, 10-hidroxi-campotecina); canaripox HL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRestM3; CARN 700; Inhibidor obtenido a partir de cartilago; carzelesina; inhibidores de quinasa caseína (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetrorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina;
 60 análogos clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisonatol; criptoficina 8; obtenido a partir de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; octofosfato citarabina; factor citolítico; citostatina; dactilimab; decitabina; deshiodridemina B; 2'-desoxicofornicina (DCF); deslorelina; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamii; diaziquona; didermnina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacidina; 9-dihidrotaxol; dioxamicina;
 65 difenil espiromustina; discodermolida; docosanol; dolasetron; doxilfluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA;

ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; ernitefur; epirubicina; epotilonas (A, R = H; B R = Me); epitilonas; episterida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; etoposida; etoposido 4'-fosfato (etopofos); exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatona; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; homoharringtonina (HHT); hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmuno-estimulantes; inhibidor del receptor de factor 1 de crecimiento similar a insulina; agonistas de Interferón; Interferones; interleucinas; yobenguano; yododoxorubicina; 4-ipomeanol; irinotecan; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolida; kahalaiida F; lamellarin-N triacetato; lanreotida; leinamicina; lenograstima; lentinan sulfato; leptostatina; letrozol; factor que inhibe la leucemia; Interferón alfa de leucocito; leuprolida + progesterona estrógeno; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lissoclinamida 7; lobaplatina; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; lutecio texafirina; losofilina; péptidos lífticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores  $\alpha$  matrilisi; inhibidores de la matriz metaloproteinasas; menogaril; mnerbarona; meterelin; metioninasa; metoclopramida; inhibidor lvHF; ifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario de emparejamiento incorrecto; mitracina; mitoguazona; mitolactol; análogos mitomicina; mitonafida; saponina del factor de crecimiento de fibroblasto mitotóxica; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostima; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; sk de pared celular miobaterium monofosforil lípido A +; mopidamol; inhibidor de gen de múltiple resistencia al fármaco; terapia con base en el supresor 1 de múltiples tumores; agente antineoplásico de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriano; miriaporona; N- acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstima; nedaplatina; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitruUyn; O $\beta$ -bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetron; ondansetron; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatina; osaterona; oxaliplatina; oxaunomicina; análogos de paclitaxel; obtenido a partir de paclitaxel; palauamina; palmitoilirizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosan polisulfato sodio; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perillilo; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor de activador de plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; podofilotoxina; porfirin sodio; porfiromicina; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores proteasoma; modulador inmune con base en proteína A; inhibidor de proteína quinasa C; inhibidores de proteína quinasa C, microalgal; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de nucleósido purina fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilatada; antagonistas raf; raltitrexed; ramosetron; inhibidores de transferasa de proteína ras farnesilo; inhibidores ras; inhibidor ras-GAP; reteliptina desmetilada; renio Re 186 etidronato; rizoxin; ribozimas; RII retinamida; rogletimida; roMtukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B 1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcodotol A; sargramostim; imitadores Sdi 1; semustina; inhibidor 1 obtenido a partir de senescencia; oligonucleótidos codificantes; inhibidores de transducción de señal; proteína de unión a antígeno monocatenaria; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sodio; fenilacetato sodio; solverol; proteína de unión somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastina 1; esqualamina; inhibidor de célula madre; inhibidores de división de célula madre; estipiamicina; inhibidores estromelina; sulfinosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; tallimustina; tamoxifen metiodida; taumomustina; tazaroteno; tecogalan sodio; tegafur; tellurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfin; temozolomida; teniposida; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; talidomida; tiocoralina; trombopoyetina; imitador trombopoyetina; tirnalfasina; agonista del receptor timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante tiroide; etil etiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topotecan; topsentina; toremifeno; factor de célula madre totipotente; inhibidores de traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento obtenido a partir de seno urogenital; antagonistas del receptor uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vector, terapia de gen eritrocito; velaresol; veramina; verdinas; verteporflna; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatina; zilascorb; y zinostatina estimalamer.

En otra realización, el paciente tratado de acuerdo con un método o uso de la invención se trata con una modalidad terapéutica de sensibilización-refuerzo que comprende la administración secuencial de una o más composiciones de sensibilización y una o más composiciones de refuerzo. Típicamente, las composiciones de sensibilización y de refuerzo utilizan diferentes vehículos que comprenden o codifican al menos un dominio antigénico en común. La composición de sensibilización se administra inicialmente al organismo anfitrión y la composición de refuerzo se administra posteriormente al mismo organismo anfitrión después de un periodo que varía de un día a doce meses. Dicho método puede comprender una a diez administraciones secuenciales de la composición de sensibilización seguido por una a diez administraciones secuenciales de la composición de refuerzo. Deseablemente, los intervalos de inyección son un asunto de una semana a seis meses. Más aún, las composiciones de refuerzo y sensibilización se pueden administrar en el mismo sitio o en sitios alternativos mediante la misma ruta o mediante diferentes rutas de administración.

De acuerdo con una realización especial, la invención se refiere a un método como se ha descrito anteriormente en donde dicha enfermedad humana es cáncer.

5 De acuerdo con una realización especial, dicho cáncer es por ejemplo cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, melanoma maligno, cáncer de laringe, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de próstata, carcinoma macrocítico (NSCLC), cánceres hematológicos, cánceres gástricos, mieloma.

De acuerdo con una realización preferida, dicho cáncer es carcinoma macrocítico (NSCLC).

De acuerdo con una realización especial, la invención se refiere a un método como se ha descrito anteriormente en donde dicha enfermedad humana es enfermedad infecciosa.

10 De acuerdo con una realización preferida, dicha enfermedad infecciones es una enfermedad inducida por virus, tal como por ejemplo enfermedad inducida por VUH, HCV, HBV, HPV, y similares.

Como se ha descrito anteriormente, el método según la presente invención permite predecir si un paciente desarrollará una respuesta profiláctica o terapéutica, preferiblemente una respuesta inmune hacia la composición inmunogénica administrada.

15 De acuerdo con una realización especial, dicha "respuesta inmune evocada" en dicha población de pacientes se dirige a antígenos relacionados con o específicos de tumores y/o a antígenos víricos. De acuerdo con una realización, dicha "respuesta inmune evocada" en dicha población de pacientes se dirige hacia distintos antígenos. De acuerdo con una realización especial, dicha "respuesta inmune evocada" en dicha población de pacientes se dirige hacia el antígeno MUC1. De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmune evocada" en dicha población de pacientes es respuesta inmune de células T, y preferiblemente respuesta inmune de CD8+ (Linfocitos T Citoxicos). De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmune evocada" en dicha población de pacientes es una respuesta inmune no específica. De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmune evocada" en dicha población de pacientes es una estimulación de la respuesta inmune innata.

25 La capacidad para inducir o estimular una respuesta inmune después de su administración a un animal u organismo humano se puede evaluar *in vitro* o *in vivo* utilizando una variedad de ensayos que son estándar en la técnica. Para una descripción general de las técnicas disponibles para evaluar el inicio y activación de una respuesta inmune, véase por ejemplo Coligan et al. (1992 y 1994, Current Protocols in Immunology; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). La medición de la inmunidad celular se puede desarrollar mediante la medición de perfiles de citocina secretados por células efectoras activadas que incluyen aquellos obtenidos a partir de células T CD4+ y CD8+ (por ejemplo cuantificación de células que producen gama IL-10 o IFN mediante ELISPOT), mediante la determinación del estado de activación de las células efectoras inmunes (por ejemplo ensayos de proliferación de célula T mediante una retoma de [<sup>3</sup>H] timidina clásica), al evaluar los linfocitos T específicos de antígeno en un sujeto sensibilizado (por ejemplo lisis específica de péptido en un ensayo de citotoxicidad) o mediante la detección de células T específicas de antígeno mediante MHC fluorescente y/o multímeros de péptido (por ejemplo tetrámeros). La capacidad de estimular una respuesta humoral se puede determinar mediante la unión de anticuerpo y/o competición en la unión (véase por ejemplo Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press). El método de la invención también se puede validar adicionalmente en modelos de animal expuestos con agente que induce tumor apropiado (por ejemplo células TCI que expresan MUC1) para determinar la actividad anti-tumor, que refleja una inducción o un mejoramiento de una respuesta inmune de anti-antígeno.

40 Así, el método de la presente invención se puede usar para determinar si la supervivencia de un paciente tratado de una enfermedad humana mediante administración de una composición inmunogénica, puede ser prolongada.

45 De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso de sICAM-1 en una muestra como un biomarcador para predecir si un sujeto es o no es susceptible a desarrollar respuesta terapéutica o profiláctica, preferiblemente una respuesta inmune profiláctica o terapéutica, mediante la administración de una composición inmunogénica, en donde dicha muestra de sangre se obtiene a partir de dicho paciente antes de la administración de la composición inmunogénica y en donde dicha composición inmunogénica contiene todo o parte de al menos un antígeno objetivo o al menos un vector recombinante que expresa *in vivo* todo o parte de al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica todo o parte de al menos un antígeno diana.

50 Más específicamente, la presente invención se refiere al uso del nivel de sICAM-1 en una muestra de sangre como un biomarcador para predecir si un sujeto es o no es susceptible a desarrollar respuesta terapéutica o profiláctica, preferiblemente respuesta inmune terapéutica o profiláctica, mediante la administración de una composición inmunogénica como se ha definido antes, en donde los bajos niveles de sICAM-1 indican predicción de que el sujeto tiene una susceptibilidad incrementada a desarrollar una respuesta profiláctica o terapéutica, preferiblemente respuesta inmune profiláctica o terapéutica.

55 En otras palabras, la presente invención se refiere al uso del nivel de sICAM-1 en una muestra de sangre como un biomarcador para predecir si un sujeto es o no es susceptible a supervivencia mayor después de la administración de una composición inmunogénica como se ha definido anteriormente, en donde los bajos niveles de sICAM-1

indican predicción de que el sujeto tiene un índice de supervivencia mayor comparado con los pacientes tratados quienes tienen niveles mayores de sICAM-1.

5 También se describen aquí kits que incluyen partes para poner en práctica los métodos descritos aquí y que serán evidentes a partir de los ejemplos proporcionados aquí. El kit de partes, o los kits, pueden incluir reactivos para recolectar y o medir los niveles de sICAM-1 totales de sangre, suero o plasma. Tales reactivos pueden incluir anticuerpos. Los equipos pueden incluir adicionalmente equipo para recolección y/o procesamiento de las muestras biológicas. Los kits también contienen instrucciones para uso, valores de corte y/o instrucciones para su determinación, e instrucciones para interpretar los datos obtenidos con el uso de los kits.

10 Dicho kit de partes, o kit, puede incluir adicionalmente una composición inmunogénica como se ha descrito anteriormente, y/o como se describe en la sección de Ejemplo adelante.

15 También se describen programas informáticos y/o algoritmos para seguir el ensayo clínico y los niveles sICAM, determinar si tales niveles están por encima o por debajo de un nivel umbral, y/o recomendar modificaciones en un régimen de tratamiento para mejorar la respuesta de un paciente a un tratamiento de inmunoterapia. Los programas informáticos o algoritmos se pueden proporcionar junto con el hardware necesario, por ejemplo, en la forma de un equipo o aparato, que también puede aceptar muestras biológicas y medir los niveles relativos de sICAM-1 presentados aquí. Los programas informáticos y/o aparatos descritos anteriormente se proporcionan a los especialistas o laboratorios clínicos con instrucciones y reactivos adecuados, incluyendo anticuerpos.

20 La invención se ha descrito en una forma ilustrativa, y se entiende que la terminología que se ha utilizado está destinada a estar en la naturaleza de las palabras de descripción a diferencia de limitación. Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención en claridad de las anteriores enseñanzas. Por lo tanto se entiende que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención se puede practicar en una forma diferente la que se describe específicamente aquí.

## Ejemplos

### Figuras :

25 **Figura 1: Curvas de supervivencia que describen inmunoterapia de vacuna en cáncer de pulmón: pacientes con  $\leq$  o  $>$  224 ng/ml de sCD54**

\_\_\_\_\_ Grupo 1 : Vacuna (es decir composición inmunogénica) + quimioterapia en pacientes con bajos niveles de sCD54. Bajos niveles se definen como  $\leq$  224 ng/ml de sCD54 en plasma de sangre periférica. 32 pacientes.

30 - - - - - Grupo 2 : Vacuna (es decir composición inmunogénica) + quimioterapia en pacientes con altos niveles de sCD54. Altos niveles se define como  $>$  224 ng/ml de sCD54 en plasma de sangre periférica. 29 pacientes.

Diferencia significativa, mediante intervalo logarítmico:  $p = 0,00006$

O Completo + Censurado

**Figura 2 : Curvas de supervivencia que describen quimioterapia en cáncer de pulmón: pacientes con  $\leq$  o  $>$  224 ng/ml de sCD54**

35 \_\_\_\_\_ Grupo 1 : Quimioterapia sola (sin vacuna) en pacientes con bajos niveles de sCD54. Bajos niveles se define como  $\leq$  224 ng/ml de sCD54 en plasma de sangre periférica. 32 pacientes.

- - - - - Grupo 2 : Quimioterapia sola (sin vacuna) en pacientes con altos niveles de sCD54. Altos niveles se define como  $>$  224 ng/ml de sCD54 en plasma de sangre periférica. 36 pacientes.

Diferencia significativa, mediante intervalo logarítmico:  $p = 0.064$  (no estadísticamente significativo)

40 O Completo + Censurado

### Ejemplo 1:

La composición inmunogénica, designada vacuna TG4010, se usó para tratar pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en combinación con quimioterapia estándar.

45 El TG4010 es un Virus Ankara Modificado recombinante (MVA) que expresa IL2 y el antígeno MUC1 asociado con tumor. Se aleatorizan ciento cuarenta y ocho pacientes para recibir:

- quimioterapia (Cisplatina  $75\text{mg}/\text{m}^2$  en d1 y Gemcitabina  $1250\text{ mg}/\text{m}^2$  en el día 1 y en el día 8 cada 3 semanas durante hasta 6 ciclos) en solitario (Rama de Estudio 2) o quimioterapia junto con TG4010 (Rama 2 del Estudio), o

- quimioterapia junto con TG4010 (Rama 1 del Estudio)

Los tumores se evalúan (criterios de la WHO) cada 6 semanas. Los puntos finales son supervivencia libre de progresión (PFS) en 6 meses y supervivencia general por el análisis con intención de tratar.

5 Se toman muestras de sangre antes de tratamiento y se embarcan inmediatamente en un laboratorio central de inmunología en donde las muestras de plasma se distribuyen en alícuotas y se congelan. Las alícuotas congeladas de plasma se envían, en lotes, en hielo seco, a un segundo laboratorio central en donde se evalúan los niveles de sCD54.

Se evalúan las muestras de plasma para determinar el contenido de sCD54 (sICAM-1) mediante el perfil de proteína de plasma Multi-analito utilizando el sistema Luminex®. El límite de 224 ng/ml es el valor de la mediana para todas las muestras analizadas de plasma de valores iniciales de 129 pacientes.

10 La Figura 1 muestra que los pacientes [Rama 1 (TG4010 + quimioterapia)] con < 224 ng/ml de sCD54 (ICAM1) a valores iniciales sobreviven más tiempo (supervivencia media = 24.5 meses) que los pacientes con > 224 ng/ml de sCD54 (ICAM-1) (supervivencia media 8.4 meses) cuando se trata con la vacuna TG4010 y quimioterapia.

15 Los datos en la Figura 2 demuestran que el efecto de seleccionar pacientes con base en el contenido de plasma de sCD54 (sICAM-1) se restringe a pacientes que reciben la vacuna. La Figura 2, que ilustra el uso de quimioterapia convencional a solas (Cisplatino 75mg/m<sup>2</sup> en d1 y Gemcitabina 1250mg/m<sup>2</sup> en el día 1 y día 8 cada 3 semanas durante hasta 6 ciclos), muestra que los pacientes con  $\leq$  o > 224 ng/ml de sCD54 (ICAM-1) en valores iniciales no tienen esperanza de supervivencia significativamente diferente. Se observa la mediana de supervivencia de 12,2 meses y 8,5 meses para  $\leq$  y > 224 ng/ml de sCD54 (ICAM-1), respectivamente.

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método ex-vivo para determinar si un paciente responderá terapéuticamente a un método de tratamiento que comprende la administración de una composición inmunogénica, en donde el método de determinación comprende la etapa de medir los niveles de sICAM-1 en dicha muestra de sangre obtenida de dicho paciente antes de la administración de dicha composición inmunogénica, en donde los bajos niveles de sICAM-1 indican que el paciente desarrollará una respuesta profiláctica o terapéutica hacia la composición inmunogénica, siendo los bajos niveles de sICAM-1 de menos que aproximadamente 300 ng/ml, y en donde dicha composición inmunogénica contiene todo o parte de al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica todo o parte de al menos un antígeno objetivo.
- 10 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde dichos bajos niveles de sICAM-1 significa niveles de menos que aproximadamente 250 ng/ml.
- 3.** El método de la reivindicación 1, en donde dichos bajos niveles de sICAM-1 significa niveles de menos que aproximadamente 224 ng/ml.
- 15 **4.** El método de la reivindicación 1, en donde dichos bajos niveles de sICAM-1 significa niveles de menos que aproximadamente 200 ng/ml.
- 5.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho método de tratamiento es un método para tratar cáncer.
- 6.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho nivel de sICAM-1 se mide con protocolos de perfil multi-análisis de proteínas plasmáticas o ensayos de inmunosorción enzimática.
- 20 **7.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho nivel de sICAM-1 se determina utilizando anticuerpos.
- 8.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha muestra de sangre se selecciona del grupo que consiste en muestra de sangre total, plasma o suero.
- 25 **9.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho vector recombinante es un vector vírico.
- 10.** El método de la reivindicación 9, en donde dicho vector vírico es competente para replicación.
- 11.** El método de la reivindicación 11, en donde dicho vector vírico es defectuoso en replicación.
- 12.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde dicho vector recombinante es un vector adenoviral recombinante.
- 30 **13.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde dicho vector recombinante es un vector de vacuna recombinante.
- 14.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde dicho vector de vacuna recombinante es un vector de MVA recombinante.
- 35 **15.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho paciente es un paciente tratado con un agente quimioterapéutico.
- 40 **16.** Uso de los niveles de sICAM-1 en una muestra de sangre como un biomarcador para predecir si un paciente es o no es susceptible a desarrollar una respuesta inmune profiláctica o terapéutica mediante la administración de una composición inmunogénica, en donde dicha muestra de sangre se obtiene a partir de dicho paciente antes de la administración de la composición inmunogénica y en donde dicha composición inmunogénica contiene todo o parte de al menos un antígeno objetivo o al menos un vector recombinante que expresa *in vivo* todo o parte de al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica todo o parte de al menos un antígeno objetivo.

Figura 1

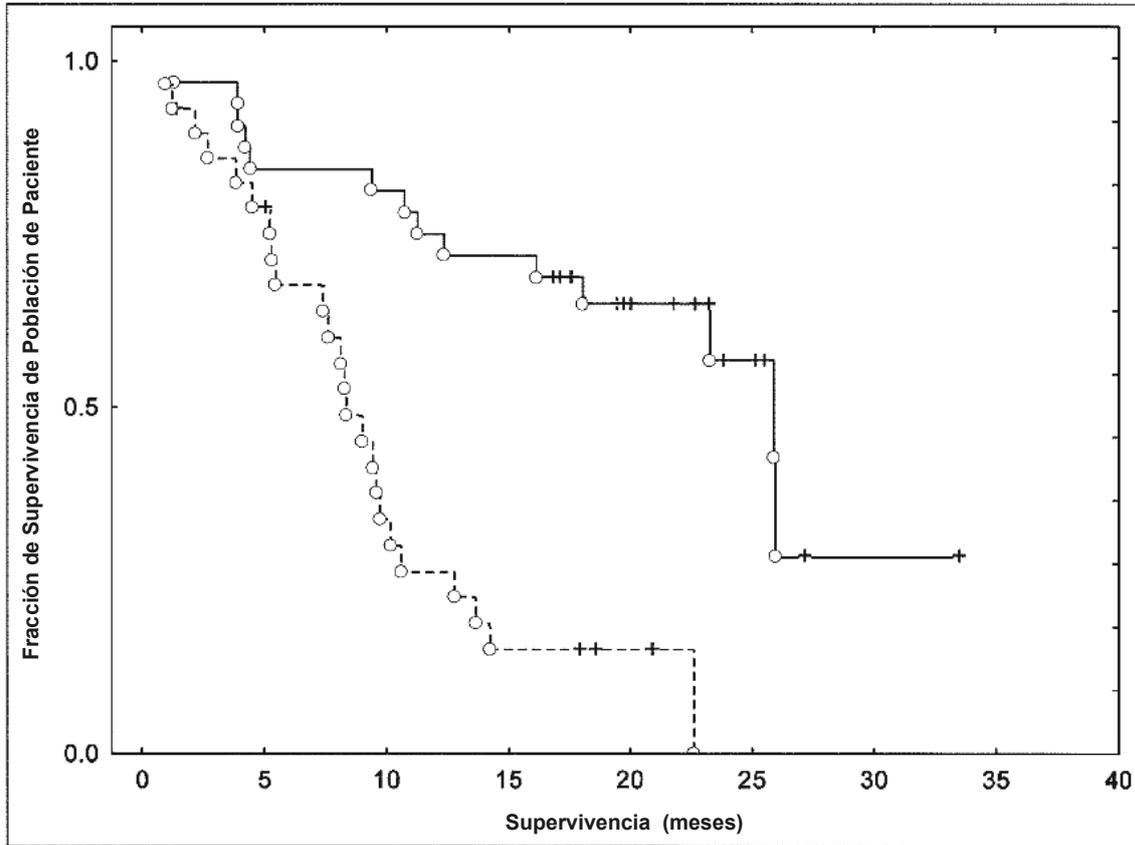


Figura 2

